

**BEST AVAILABLE COPY***AP*

10

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : **05-039306**  
 (43)Date of publication of application : **19.02.1993**

(51)Int.Cl.

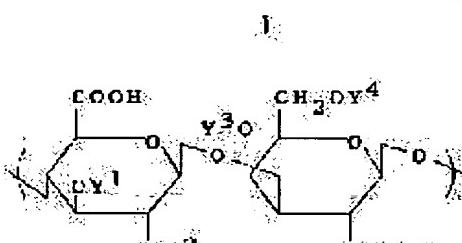
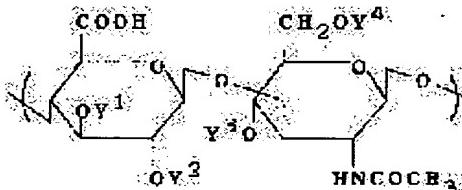
**C08B 37/08****A61K 31/725****A61K 47/36****A61K 47/48****C07K 9/00**(21)Application number : **03-330905**(71)Applicant : **D D S KENKYUSHO:KK**(22)Date of filing : **13.12.1991**(72)Inventor : **MORIMOTO HIDEYUKI  
ITO TERUOMI  
INOUE KAZUHIRO  
OKUNO SATORU**

(30)Priority

Priority number : **02402256**Priority date : **14.12.1990**Priority country : **JP****(54) HYALURONIC ACID AND CHONDROITIN DERIVATIVE****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a polysaccharide derivative or its salt which holds a drug through a chemical bond and is capable of drug delivery by bonding a drug to the hydroxyl groups of hyaluronic acid or chondroitin through a peptide chain.

**CONSTITUTION:** The objective polysaccharide derivative or its salt comprises units of formula I or II and has a molecular weight of 3,000–800,000 as determined by gel filtration. In formulas I and II, Y1, Y2, Y3 and Y4 may be the same or different and are each a hydrogen atom, a group CONH<sub>2</sub> or a group of formula III (wherein Z1 is a peptide chain comprising 1–5 same or different amino acids; P is a hydrogen atom, a hydroxyl group or a protective group; W is an oxygen atom or a group NH; provided that C—Z1 is a C—N bond) or any two of Y1 to Y4 may be combined with each other to form a group of formula IV (wherein Z2 is Z1; P is a group of formula III; provided that C—Z2 bond is a C=N bond).



**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 19.11.1993  
[Date of sending the examiner's decision of rejection]  
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number] 2604930  
[Date of registration] 29.01.1997  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right] 29.01.2000

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-39306

(43) 公開日 平成5年(1993)2月19日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
 C 0 8 B 37/08  
 A 6 1 K 31/725  
 47/36  
 47/48  
 C 0 7 K 9/00  
 識別記号 Z 8615-4C  
 AGA 8314-4C  
 Z 7329-4C  
 Z 7329-4C  
 ZNA 8318-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数14(全 23 頁)

(21) 出願番号 特願平3-330905  
 (22) 出願日 平成3年(1991)12月13日  
 (31) 優先権主張番号 特願平2-402256  
 (32) 優先日 平2(1990)12月14日  
 (33) 優先権主張国 日本 (JP)

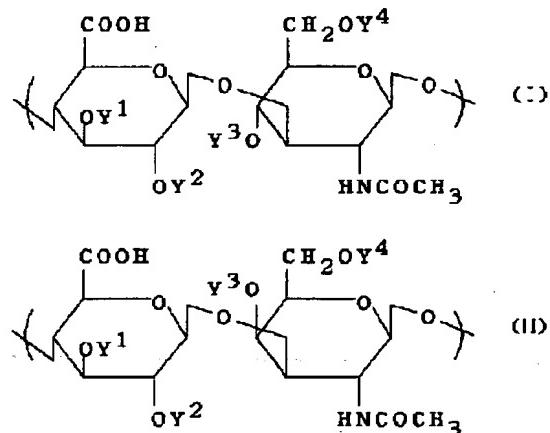
(71) 出願人 390031462  
 株式会社デイ・ディ・エス研究所  
 東京都千代田区三番町26番地  
 (72) 発明者 森本秀幸  
 神奈川県横浜市鶴見区駒岡町195-1 ア  
 ナバサード三ツ池公園 G202  
 (72) 発明者 伊藤照臣  
 千葉県松戸市新松戸6-89-104  
 (72) 発明者 井上和泓  
 千葉県船橋市松ヶ丘5-6-6  
 (72) 発明者 奥野哲  
 埼玉県三郷市早稲田8-5-18  
 (74) 代理人 弁理士 佐藤一雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸およびコンドロイチン誘導体

## (57) 【要約】 (修正有)

【目的】 薬物を化学結合を介して保持し、薬物送達が可能な多糖誘導体であって、長期体内残留がなく、癌組織への移行性ある多糖誘導体を提供する。

【構成】 ヒアルロン酸またはコンドロイチンの水酸基、または、ヒアルロン酸またはコンドロイチンを開裂し、開裂末端のアルデヒド基を還元して得られたポリアルコール体の水酸基にペプチド鎖を介して薬物を結合する。



[式中、Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup> およびY<sup>4</sup> は水素原子-CO-NH<sub>2</sub>、または特定の基を示す]

1

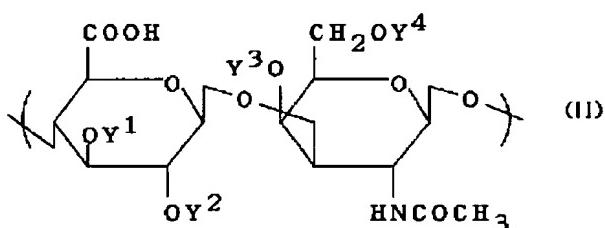
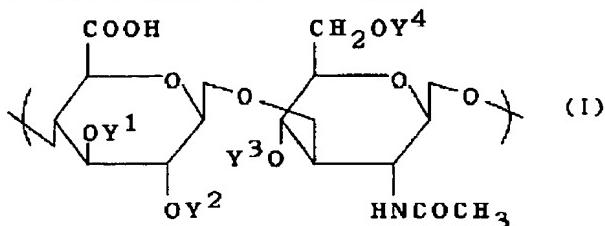
2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の一般式(I)または(II)で表わされる単位から構成される、ゲルろ過法による分子量が\*  
れる単位から構成される、ゲルろ過法による分子量が\*

\*3,000~800,000である、多糖誘導体および  
その塩。

## 【化1】

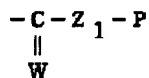


〔前記式中、

Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup> およびY<sup>4</sup> は、同一または異なってい  
てもよく、それぞれ水素原子、基-CO NH<sub>2</sub>、また  
は、

下記一般式(III)で表わされる基：

## 【化2】

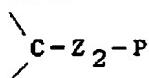


(III)

(式中、

Z<sub>1</sub> は1~5個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表わし、  
Pは水素原子、水酸基または保護基を表わし、  
Wは酸素原子または基NHを表わす。ただし、C-Z<sub>1</sub>  
結合はC-N結合である)、を表わすか、もしくは、  
Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup> およびY<sup>4</sup> のうち、いずれか2つが一  
緒になって結合して下記一般式(IV)で表わされる基：

## 【化3】



(IV)

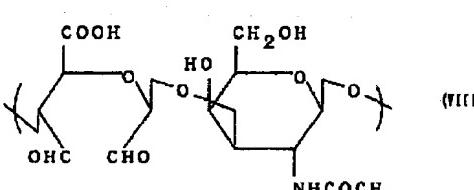
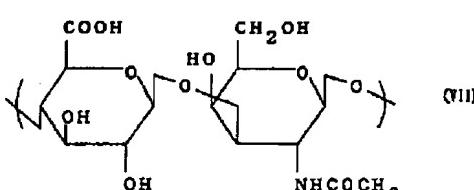
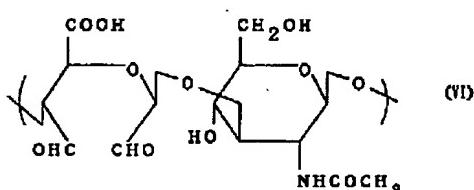
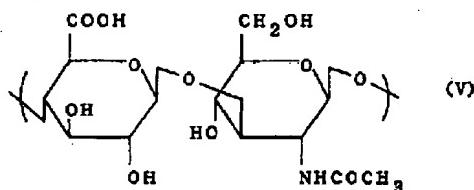
(式中、

Z<sub>2</sub> は1~5個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表わし、  
Pは前記一般式(III)で定義したものと同義である。た  
だし、C=Z<sub>2</sub> 結合はC=N結合である)を表わす。た  
だし、Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup> およびY<sup>4</sup> として前記一般式  
(III)で表わされる基または前記一般式(IV)で表わ  
される基を有する単位が分子中に少なくとも1以上存  
在する。〕

【請求項2】下記の式(V)および式(VI)または式  
(VII)および式(VIII)で表される単位から構成され  
る単位から構成される、ゲルろ過法による分子量が\*

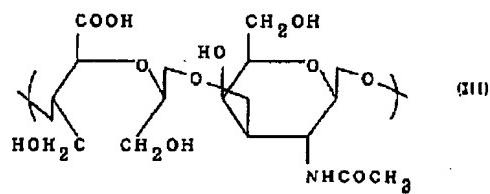
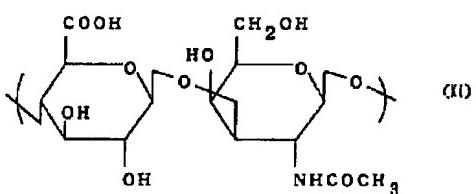
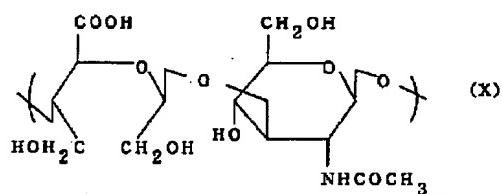
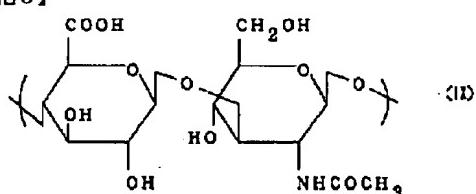
る、ゲルろ過法による分子量が1,000~800,000  
である、多糖誘導体およびその塩。

## 【化4】



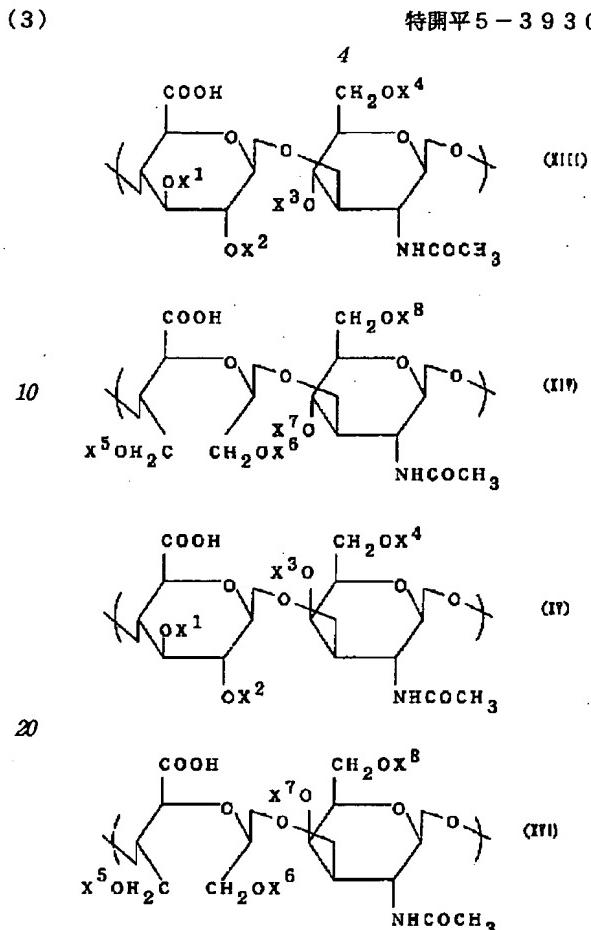
【請求項3】下記の式(IX)および式(X)または式  
(XI)および式(XII)で表される単位から構成される、  
ゲルろ過法による分子量が1,000~800,000

である、多糖誘導体およびその塩。  
【化5】



【請求項4】下記の式(XIII)および式(XIV)または式(XV)および式(XVI)で表される単位から構成される、  
ゲルろ過法による分子量が1,000~800,000  
である、多糖誘導体およびその塩。

【化6】



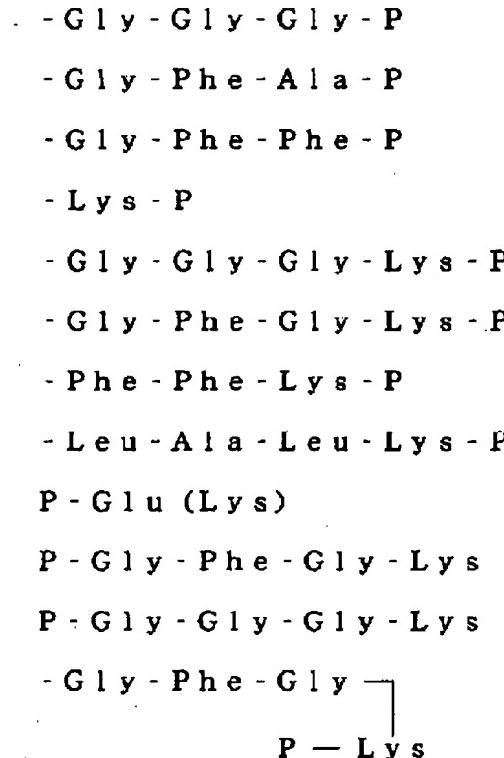
〔前記式中、  
X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup> および X<sup>8</sup>  
は、同一または異なるてもよく、それぞれ水素原子、基-CO NH<sub>2</sub>、または、  
請求項1で定義した一般式(III)で表わされる基を表  
わすか、もしくは、  
X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup> および X<sup>4</sup> または X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup> お  
よび X<sup>8</sup> のうちいずれか 2 つの基が一緒にになって結合し  
て請求項1で定義した一般式(IV)で表わされる基を表  
わす。ただし、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、  
X<sup>7</sup> および X<sup>8</sup> として前記一般式(III)で表わされる  
基または前記一般式(IV)で表わされる基を有する単位  
が分子中に少なくとも 1 以上存在する。〕

【請求項5】分子中の単糖単位の総モル数 a と、分子中  
に導入された Z<sub>1</sub> または Z<sub>2</sub> で表わされるペプチド鎖の  
モル数 b とが、b/a = 1/2 ~ 1/100 の関係にある、  
請求項1または4記載の多糖誘導体およびその塩。

【請求項6】Z<sub>1</sub> および Z<sub>2</sub> が 1 ~ 4 個の同一または異  
なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表わし、その C  
末端側アミノ酸に P が結合してなる、請求項1または4  
記載の多糖誘導体およびその塩。

【請求項7】Z<sub>1</sub>-P および Z<sub>2</sub>-P が、下記のいずれか  
である、請求項1または4のいずれか一項記載の多糖  
誘導体およびその塩。

【化7】



【請求項8】請求項1、4～7のいずれか一項記載の多糖誘導体のPで表される水素原子または水酸基が、さらに基OR<sup>1</sup>、COR<sup>2</sup>もしくはNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>

(ここで、

基OR<sup>1</sup>は、一般式R<sup>1</sup>OHで表されるアルコール性水酸基を有する医薬化合物のアルコール性水酸基から水素原子を除いた残基を表し、

基COR<sup>2</sup>は、一般式R<sup>2</sup>COOHで表されるカルボキシル基を有する医薬化合物のカルボキシル基から水酸基を除いた残基を表し、

基NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>は、一般式R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>NHで表されるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を一個除いた残基を表す)で置換されてなる、多糖誘導体およびその塩。

【請求項9】一般式R<sup>2</sup>COOHで表されるカルボキシル基を有する医薬化合物がメソトレキサートである、請求項8記載の多糖誘導体およびその塩。

【請求項10】ヒアルロン酸またはコンドロイチンにシアノゲンハライドを反応させた後、ペプチド鎖を反応させることからなる、請求項1記載の多糖誘導体およびその塩の製造法。

【請求項11】ヒアルロン酸またはコンドロイチンに過ヨウ素酸またはその塩を反応させることからなる、請求項2記載の多糖誘導体およびその塩の製造法。

【請求項12】ヒアルロン酸またはコンドロイチンに過ヨウ素酸またはその塩を反応させ、次に水素化ナトリウムを反応させることからなる、請求項3記載の多糖誘導体およびその塩の製造法。

【請求項13】ヒアルロン酸またはコンドロイチンに過ヨウ素酸またはその塩を反応させ、次に水素化ナトリウムを反応させ、更にシアノゲンハライドを反応させた後、ペプチド鎖を反応させることからなる、請求項4記載の多糖誘導体およびその塩の製造法。

【請求項14】請求項1又は4記載の多糖誘導体のPを、一般式R<sup>1</sup>OHで表されるアルコール性水酸基を有する医薬化合物、一般式R<sup>2</sup>COOHで表されるカルボキシル基を有する医薬化合物または一般式R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>NHで表されるアミノ基を有する医薬化合物と置換することからなる、請求項8記載の多糖誘導体の製造法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】【発明の背景】

【産業上の利用分野】本発明は新規なヒアルロン酸およびコンドロイチンの誘導体に関する。更に詳しくは、長期体内残留がなく、癌組織への移行性のある多糖型高分子担体およびこれに薬物が結合した複合体としてのヒアルロン酸およびコンドロイチンの誘導体に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】水溶性高分子を薬物担体として使用することは、従来からとりわけ製剤の分野において試みられ、関連する多数の技術が提供されてきた。多くの場合においてカルボキシメチルセルローズ、ヒドロキシプロピルセルローズ、ヒドロキシプロピルメチルセルローズ等のセルローズ誘導体が使用され、これらの物質自体の物理化学的性状を利用して薬物の分散化、徐放化等が意図してきた。しかしこれらの例においては薬物は担体としてのセルローズ誘導体と製剤的な混合によって一体化はしているものの、担体に化学結合しているものではない。

【0003】ところで、薬物を必要な組織に必要な時に必要な量だけ送達する、いわゆる臓器指向の技術において、水溶性高分子を薬物担体として利用する場合には、単なる混合ではなく、薬物が担体に化学結合する必要がある。そのような試みとしては下記文献1), 2), 3)があり、1)ではデキストランにマイトイシンCを結合する技術、2)ではマンナンにマイトイシンCを結合する技術、3)では同じくマンナンにブレオマイシンを結合する技術がそれぞれ開示されている。

1) 濑崎 仁: 薬学雑誌, 109, 611-621, (1989)

2) 第49回日本癌学会総会記事(1990)425頁、演題番号2155

3) 第49回日本癌学会総会記事(1990)425頁、演題番号2154

【0004】しかし、多糖型水溶性高分子の中でもいわゆるムコ多糖類と称される一群の酸性多糖高分子を担体として利用し、これに薬物を化学結合して薬物送達を行

う技術についてはその試みは未だ十分な展開がなされていないのが実状である。

【0005】そこで、本発明者の中の一部の者は先にキチン、キトサンを使用して上記の技術の試みを行ったところ、意外にもN-アセチルカルボキシメチルキトサン誘導体が優れた薬物送達の可能性を示すことを見出だした(特願平2-215803号明細書)。そこで、適切な修飾を加えることによってムコ多糖が上記の可能性を持つこと、とりわけ酸性ムコ多糖の代表であるヒアルロン酸あるいはコンドロイチンがキチン、キトサンにおけると同様にこれに適切な修飾を加えることによって前記のような可能性を示すことが期待されるに至った。

【0006】しかしながらヒアルロン酸あるいはコンドロイチンにおける上記関連技術については、僅かに下記文献4)および5)があり、白金錯体について述べられているが、応用の一般的な展開は見られていない。

4) 第48回日本癌学会総会記事(1989)374頁、演題番号2107

5) 第49回日本癌学会総会記事(1990)394頁、演題番号1972また特開昭62-64802号公報には、ヒアルロン酸エステルが開示されている。

しかしこにおいてもヒアルロン酸のカルボキシル基をエステル化するにとどまっており、上記の技術における担体としての利用に至る展開は見られてない。

10

20

\* \*

\* 【0007】上記にかんがみ本発明者はヒアルロン酸およびコンドロイチンについて検討を行い、その結果、ヒアルロン酸およびコンドロイチンを構成する単位二糖の遊離水酸基に、更にはヒアルロン酸およびコンドロイチンを酸化開環し、開裂末端のアルデヒド基を還元して得られたポリアルコール体の水酸基にペプチド鎖を介して薬物を結合することによって目的が達成されることを知り、本発明を完成するに至った。

#### 【0008】[発明の概要]

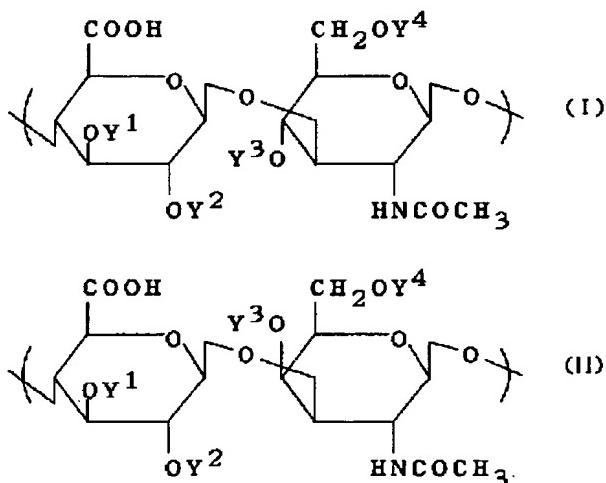
【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、薬物を化学結合を介して保持し、薬物送達が可能な多糖誘導体およびその塩を提供することを目的としている。また本発明は、長期体内残留がなく、癌組織への移行性ある多糖誘導体であって、これに薬物が化学結合可能な薬物担体を提供することを目的としている。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明による第一の態様の多糖誘導体は、下記の一般式(I)または(II)で表される単位から構成される、ゲルろ過法による分子量が3,000~800,000であるものおよびその塩である。

#### 【0010】

#### 【化8】



【0011】前記式(I)および(II)中、Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup>およびY<sup>4</sup>は、同一または異なっていてもよく、それぞれ水素原子、基-CO-NH<sub>2</sub>、または、下記一般式(III)で表わされる基:

【0012】

【化9】

$$-\underset{\substack{|| \\ W}}{C-Z_1-P}$$
 (III)

40 原子、水酸基または保護基を表わし、Wは酸素原子または基NHを表わす。ただし、C-Z<sub>1</sub>結合はC-N結合である)、を表わすか、もしくは、Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup>およびY<sup>4</sup>のうち、いずれか2つが一緒になって結合して下記一般式(IV)で表わされる基:

#### 【0014】

#### 【化10】

$$\begin{array}{c} \diagdown \\ C-Z_2-P \end{array}$$
 (IV)

【0013】(式中、Z<sub>1</sub>は1~5個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表わし、Pは水素

50 【0015】(式中、Zは1~5個の同一または異なる

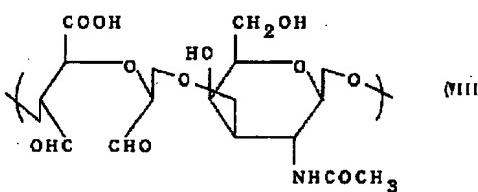
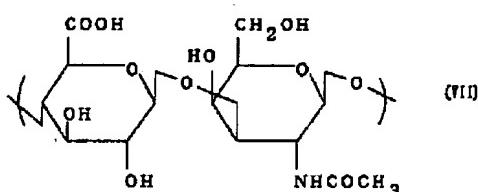
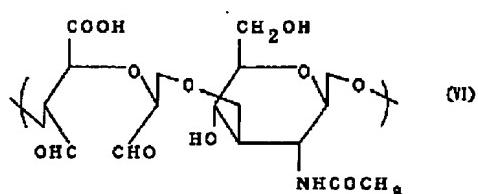
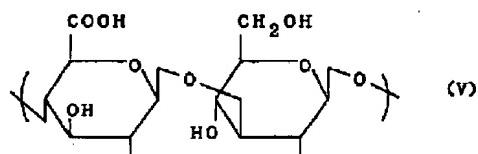
9

アミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表わし、Pは前記一般式(III)で定義したものと同義である。ただし、C=Z<sub>2</sub>結合はC=N結合である)を表わす。ただし、Y<sup>1</sup>、Y<sup>2</sup>、Y<sup>3</sup>およびY<sup>4</sup>として前記一般式(III)で表わされる基または前記一般式(IV)で表わされる基を有する単位が分子中に少なくとも1以上存在する。】

【0016】更に、本発明による第二の態様の多糖誘導体は、下記の一般式(V)および(VI)または(VII)および(VIII)で表わされる単位から構成される、ゲルろ過法による分子量が1,000~800,000であるものおよびその塩である。

【0017】

【化11】

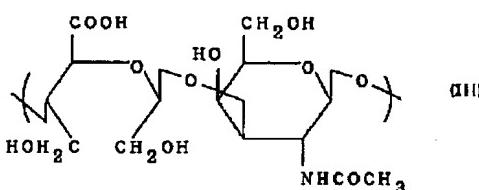
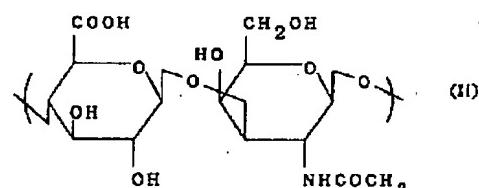
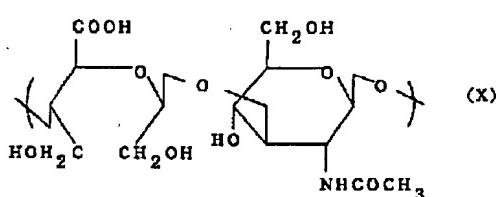
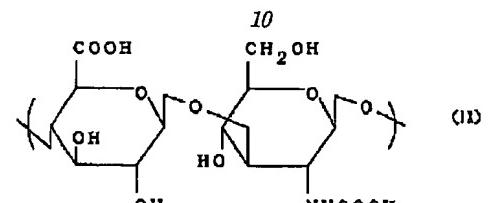


【0018】更に、本発明による第三の態様の多糖誘導体は、下記の一般式(IX)および(X)または(XI)および(XII)で表わされる単位から構成される、ゲルろ過法による分子量が1,000~800,000であるものおよびその塩である。

【0019】

【化12】

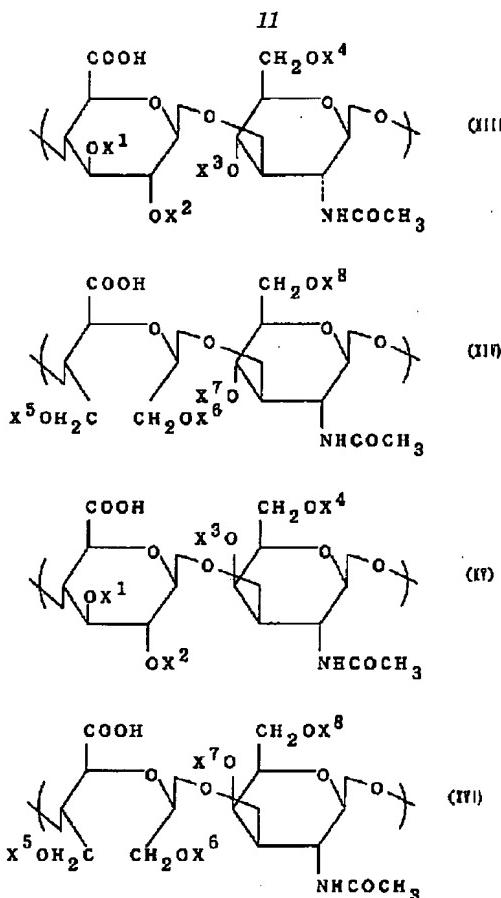
20



【0020】更にまた、本発明による第四の態様の多糖誘導体は、下記の一般式(XIII)および(XIV)または(XV)および(XVI)で表わされる単位から構成されるゲルろ過法による分子量が1,000~800,000であるものおよびその塩である。

【0021】

【化13】



【0022】〔前記式中、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ および $X^8$ は、同一または異なっていてもよく、それぞれ水素原子、基-CONH<sub>2</sub>、または、前記で定義した一般式(III)で表わされる基を表わすか、もしくは、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ および $X^4$ または $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ および $X^8$ のうちいずれか2つの基が一緒になって結合して請求項1で定義した一般式(IV)で表わされる基を表わす。ただし、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ および $X^8$ として前記一般式(III)で表わされる基または前記一般式(IV)で表わされる基を有する単位が分子中に少なくとも1以上存在する。〕

#### 【0023】〔発明の具体的説明〕

(多糖誘導体) 前記一般式(I)で表される二糖単位において、 $Y^1 = Y^2 = Y^3 = Y^4 = H$ のもの、すなわち、N-アセチル-3-O-β-D-グルコピラヌロシル-D-グルコサミンを繰り返し単位とした高分子化合物がいわゆるヒアルロン酸である。また、一般式(II)で表される二糖単位において、 $Y^1 = Y^2 = Y^3 = Y^4 = H$ のもの、すなわち、N-アセチル-3-O-β-D-グルコピラヌロシル-D-ガラクトサミンを繰り返し単位とした高分子化合物がいわゆるコンドロイチンである。従って、本発明による第一の態様の多糖誘導体は、ヒアルロン酸またはコンドロイチンの水酸基にペプチド鎖が導入されてなる誘導体である。

#### 12

鎖が導入されてなる誘導体、である。

【0024】一般式(I)および(II)において、 $Y^1$ 、 $Y^2$ 、 $Y^3$ および $Y^4$ は、それぞれ水素原子、基-CONH<sub>2</sub>もしくは前記一般式(III)で表される基を表すか、もしくは、 $Y^1$ 、 $Y^2$ 、 $Y^3$ および $Y^4$ のうち、いずれか2つが一緒になって結合する、前記一般式(IV)で表される基を表す。ただし、 $Y^1$ 、 $Y^2$ 、 $Y^3$ および $Y^4$ として前記一般式(III)で表される基もしくは前記一般式(IV)で表される基を有する単位が分子中に少なくとも1以上存在する必要がある。

【0025】また、前記式(V)または式(VII)で表される二糖単位はヒアルロン酸またはコンドロイチンを構成する単位であり、前記式(VI)または式(VIII)で表される二糖単位は式(V)または式(VII)で表される単位のグルクロン酸の2位と3位の間の結合が開裂した構造を有する。従って、本発明による第二の態様の多糖誘導体は、ヒアルロン酸またはコンドロイチンの分子中の一部の二糖単位においてそのグルクロン酸の2位と3位の間の結合が開裂され、その開裂末端がアルデヒド基であるものということが出来る(なお、この第二の態様の多糖誘導体を「開環アルデヒド体」という場合がある)。

【0026】またさらに、前記式(IX)または式(XI)で表される二糖単位はヒアルロン酸またはコンドロイチンを構成する単位であり、前記式(X)または式(XII)で表される二糖単位は式(IX)または式(XI)で表される単位のグルクロン酸の2位と3位の間の結合が開裂した構造を有する。従って、本発明による第三の態様の多糖誘導体は、ヒアルロン酸またはコンドロイチンの分子中の一部の二糖単位においてそのグルクロン酸の2位と3位の間の結合が開裂され、その開裂末端がヒドロキシメチル基であるものであるといふことが出来る(なお、この第三の態様の多糖誘導体を「開環ポリアルコール体」という場合がある)。

【0027】これらの多糖誘導体のグルクロン酸の開裂の程度は特に限定されないが、その誘導体である後記する式(XIII)および(XIV)または(XV)および(XVI)で表される単位から構成される多糖誘導体とされたときの水溶性を考慮して決定されるのが好ましい。

【0028】前記式(XIII)、(XIV)、(XV)および(XVI)で表される二糖単位において、 $X^1$ ～ $X^8$ がすべて水素原子であるものは、それぞれ前記式(IX)、(X)、(XI)および(XII)で表される二糖単位である。従って、本発明による第四の態様の多糖誘導体は、本発明による第三の態様の多糖誘導体の水酸基にペプチド鎖が導入されてなる誘導体である。この第四の態様の多糖誘導体は、第一の態様の多糖誘導体よりも水溶性が高く、より疎水性の薬物を導入しても好ましい水溶性を保持するので有利である。

【0029】式(XIII)、(XIV)、(XV)および(XVI)において、 $X^1$ ～ $X^8$ は同一または異なっていてもよ

13

く、それぞれ水素原子、基-CONH<sub>2</sub>または前記一般式(III)で表される基を表すか、もしくは、X<sup>1</sup>～X<sup>4</sup>のうちのいずれか2つまたはX<sup>5</sup>～X<sup>8</sup>のうちいずれか2つが一緒に結合する前記一般式(IV)で表される基を表す。ただし、X<sup>1</sup>～X<sup>8</sup>として前記一般式(I)または前記一般式(IV)で表される基を有する単位が分子中に少なくとも一つ以上存在することが必要である。

【0030】一般式(III)および(IV)において、Z<sub>1</sub>もしくはZ<sub>2</sub>は1～5個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表す。ここで、このアミノ酸の数は薬物放出特性や抗原性を考慮すると、1～4個が好ましい。さらに、このペプチド鎖はアミノ酸のみから構成されている場合に加えて、鎖中の一部にアミノ酸以外の化合物を含む場合も包含する意味に用いる。例えば、コハク酸のような二塩基性カルボン酸がペプチド鎖の中にまたは末端に存在していてもよい。また、このペプチド鎖を構成するアミノ酸は、α-アミノ酸のほかに、ε-アミノカプロン酸、γ-アミノ酪酸などのアミノ酸類似の化合物であってもよい。また、ペプチド鎖の結合方向は、ヒアルロン酸またはコンドロイチンにN末端側から結合しているのが通常であるが、例えばペプチド鎖中にLysが存在する場合には、ε-アミノ基を結合させることによってペプチド鎖の結合方向を逆転させてもよい。

【0031】また、ペプチド鎖にPが結合する位置は、ペプチド鎖の末端および鎖中のいずれでもよい。従って、このペプチド鎖の末端または鎖中に結合するPが水素原子または水酸基のときは、それぞれそのペプチド鎖の末端または鎖中アミノ酸のアミノ基の水素原子または末端または鎖中アミノ酸のカルボキシル基の水酸基を表すものである。

【0032】本発明による多糖誘導体においてZ<sub>1</sub>およびZ<sub>2</sub>で表されるペプチド鎖の好ましい具体例を示せば下記の通りである。

【0033】

【化14】

10

20

30

40

50

14

- Gly - Gly - Gly - P  
 - Gly - Phe - Ala - P  
 - Gly - Phe - Phe - P  
 - Lys - P  
 - Gly - Gly - Gly - Lys - P  
 - Gly - Phe - Gly - Lys - P  
 - Phe - Phe - Lys - P  
 - Leu - Ala - Leu - Lys - P  
 P - Glu (Lys)  
 P - Gly - Phe - Gly - Lys  
 P - Gly - Gly - Gly - Lys  
 - Gly - Phe - Gly -  
 P — Lys

【0034】また、本発明による多糖誘導体のペプチド鎖はその末端または鎖中にアミノ基あるいはカルボキシル基が保護されていてもよい。保護基は一般的にアミノ酸の保護に用いられているものであれば制限されないが、例えば、アミノ保護基としてはt-ブトキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基、また、カルボキシル基の保護基としては低級アルコキシ基、例えばt-ブチルオキシ基、ベンジルオキシ基、低級アルキルイミノ基、例えばメチルイミノ基などを挙げることができる。

【0035】本発明による前記一般式(I)または(I')を単位とする多糖誘導体は、ゲルろ過法による、ピーク位置の分子量が3,000～800,000範囲にある。また本発明による前記式(V)および(VI)または(VII)および(VIII)で表わされる単位から構成される多糖誘導体ならびに前記式(IX)および式(X)または式(XI)および(XII)で表わされる単位から構成される多糖誘導体は、ゲルろ過法によるピーク位置の分子量が1,000～800,000の範囲にある。

【0036】また、本発明による多糖誘導体におけるペプチド鎖の存在量は、その用途にしたがって適宜決定されてよい。分子中の単糖単位の総モル数をaとして、分子中に導入されたZ<sub>1</sub>および/またはZ<sub>2</sub>で表されるペプチド鎖の総モルをbとした場合、この両者の間にb/a(置換度)=1/2～1/100の関係が成立するものが好ましい。この置換度は例えば以下に説明するNMR法または吸光光度法によって算出することができる。

15

## 【0037】NMR法

標品についてプロトン-NMRを測定する。構成成分であるN-アセチル-D-グルコサミン残基あるいはN-アセチル-D-ガラクトサミン残基のアセチル基の三個のプロトンに由来する吸収ピークは2.0 ppm付近に観察される。一方、このピークと、Z<sub>1</sub>-Pおよび/ZまたはZ<sub>2</sub>-Pのプロトンに由来する吸収ピークが分離して観察される場合には、両者の吸収強度を利用して置換度を次式より求めることが可能である。

## 【0038】

【数1】

$$b/a = \frac{Iy/n}{Is/3} \times 1/2$$

I s : N-アセチル-D-グルコサミン残基あるいはN-アセチル-D-ガラクトサミン残基のアセチル基のプロトン由来の吸収ピークの積分値

I y : Z<sub>1</sub>-Pおよび/ZまたはZ<sub>2</sub>-Pのプロトンに由来の吸収ピークの積分値

n : I y に対応するプロトンの個数

## 【0039】吸光度法

Z<sub>1</sub>-Pおよび/ZまたはZ<sub>2</sub>-Pに特性吸収がある場合に、吸光度法によりこの置換基の含量(重量%)を求め、次式に従って置換度を求めることができる。

## 【0040】

【数2】

$$b/a = \frac{Cy/My}{(100-Cy)/Ms} \times 1/2$$

C y : Z<sub>1</sub>-Pおよび/ZまたはZ<sub>2</sub>-Pの含量(重量%)

M y : Z<sub>1</sub>-Pおよび/ZまたはZ<sub>2</sub>-Pの分子量

M s : 式(I)または式(II)で表わされる単位から構成される多糖誘導体の置換度を求める場合、M s はヒアルロン酸またはコンドロイチンを構成する二糖単位の分子量である。なお、ナトリウム塩の場合の分子量はヒアルロン酸、コンドロイチンいずれの場合も401である。

また、式(XIII)および式(XIV)または式(XV)および式(XVI)で表される単位から構成される多糖誘導体の置換度を求める場合、M s は式(IX)または式(XI)で表される単位の分子量(401)と、式(X)または(XII)で表される単位の分子量(403)との、式(IX)と式(X)の存在比または式(XI)と式(XII)との存在比の重み付け平均値である。

【0041】本発明による多糖誘導体は、その塩として存在することができるが、その用途を考慮すれば薬学上許容可能な塩であることが好ましい。そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属の

10

16

塩および、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。特にナトリウム塩、カリウム塩が好ましい。

【0042】本発明による多糖誘導体は、前記したZ<sub>1</sub>およびZ<sub>2</sub>で表されるペプチド鎖の末端または鎖中に、生理活性を有した化合物を化学結合によって保持させることができある。従って、本発明による多糖誘導体は薬物輸送の担体として利用することができる。また、本発明による多糖誘導体は、薬物送達に必要な時間内において十分な血中安定性を示す一方、生体内で徐々に分解を受け、長時間の体内残留が起こらないことが期待される。さらにまた、本発明による多糖誘導体は、癌組織移行性に優れている点も有利である。

20

【0043】本発明による多糖誘導体におけるペプチド鎖への薬物の結合は、例えばペプチド鎖の末端または鎖中アミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基のPで表される水素原子あるいは水酸基と置換してペプチド鎖と結合することによってなされる。例えば、一般式R<sup>1</sup>OHで表されるアルコール性水酸基を有したアルコール系医薬化合物は末端または鎖中アミノ酸のカルボキシル基と結合することが可能である。また、一般式R<sup>2</sup>COOHで表されるカルボキシル基を有したカルボン酸系医薬化合物は末端または鎖中アミノ酸のアミノ基と結合することが、また、一般式R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>NHで表されるアミノ基を有したアミノ系医薬化合物もまた末端または鎖中アミノ酸のカルボキシル基と結合することが可能である。このような医薬化合物の具体例として、カルボン酸系医薬化合物としては、メソトレキサート、ブメタニド、フロセミド、ジノプロストなどが挙げられ、アルコール系医薬化合物としては、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンプラスチン、アドレナリンなどが挙げられ、また、アミノ系医薬化合物としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンC、プレオマイシンなどが挙げられる。

30

【0044】(多糖誘導体の製造) 本発明による多糖誘導体の基本をなすヒアルロン酸は、臍帯、皮膚、腱、関節液、さらにサメの皮、クジラの軟骨、ヒト血清、鶏冠などの広く動物組織中に存在しており、これらの組織から抽出して利用することができる。また、市販品を利用することも可能である。

40

【0045】ヒアルロン酸の平均分子量は10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup>程度であることから、本発明による多糖誘導体に用いるためには、適当な分子量に低分子量化することが必要となる。低分子量化は、ヒアルロニダーゼなどの酵素による加水分解によって容易に行うことができる。

【0046】例えば、ヒト臍帯由来ヒアルロン酸に、その約1/200量のウシ睾丸ヒアルロニダーゼをpH 5.0、37℃で2時間反応させることにより、分子量10<sup>5</sup>に低分子化されたヒアルロン酸を得ることができる。酵素量や反応時間を調節することにより、得られる

17

ヒアルロン酸の分子量は、増減させることができる。また、この酵素反応で低分子化されるヒアルロン酸の由来は、ヒト臍帯に限らない。低分子化したヒアルロン酸は、そのまま薬物担体の素材として化学修飾することも可能であるが、混在する蛋白や他のムコ多糖を除去した後に用いることが望ましい。その精製は、ムコ多糖の精製法として知られるプロテアーゼを用いる除蛋白法やセチルビリジニウムクロリドなどの第四級アンモニウム塩による分画、エタノール分画などの方法を組み合わせて行うことができる。

【0047】コンドロイチンについては、角膜やスルメイカ、マダコなどの頭足類から抽出することができる。また、コンドロイチン硫酸を脱硫酸することによって得ることができ、市販もされている。コンドロイチン硫酸Aを脱硫酸したコンドロイチンの場合、分子量はおよそ $10^4$ であり、これをそのまま本発明による薬物担体の素材として用いることができる。

【0048】本発明による第二の態様の多糖誘導体は、ヒアルロン酸またはコンドロイチンから、グルクロン酸の2位と3位の結合を酸化開裂して得ることができる。まず、上記のようにして得た低分子量化されたヒアルロン酸またはコンドロイチンに酸化剤（例えば過ヨウ素酸またはその塩）を作用させることによって、開環アルデヒド体を得ることができる。この反応は反応に関与しない溶媒（例えば水）中の温和な条件、例えば $0 \sim 10^\circ\text{C}$ の温度で、1～3週間で完了させることができる。反応後多糖誘導体は、反応液を透析し、沈殿助剤（例えば酢酸ナトリウム）を加え、エタノールで析出させることによって得ることができる。

【0049】更にこうして得た多糖誘導体のアルデヒド基を還元することにより、開環ボリアルコール体とすることができます。還元剤としては、例えば水素化ホウ素ナトリウムなどを用いることができる。この反応は反応に関与しない溶媒（例えば水）中の温和な条件、 $0 \sim 30^\circ\text{C}$ の温度で、1～3日間で完了させることができる。反応後多糖誘導体は、反応液をpH5程度に調整し、エタノールで析出させることによって得ることができる。

【0050】次にこの低分子量化されたヒアルロン酸およびコンドロイチン、または、開裂され、開裂末端を基-CH<sub>2</sub>OHとされた多糖誘導体を、R. Alenらの方法（R. Alen, et al. Eur. J. Biochem. 18, 351-360 (1971)）に類似の方法によって化学修飾し、分子中に存在する水酸基にペプチド鎖を導入する。具体的には下記のようにして導入を行う。

【0051】まず、ヒアルロン酸もしくはコンドロイチンまたは式(XIX)および式(X)または式(XI)および式(XII)で表わされる単位から構成される多糖誘導体を水に溶かし、溶液のpHを塩基性、好ましくは $10 \sim 11.5$ に保ちながら、シアノゲンハライド、例えばプロムシアン、を反応させて糖残基中の水酸基を活

10

20

30

40

50

18

性化する。ヒアルロン酸またはコンドロイチンの糖残基数とプロムシアンのモル比は、1:20～10:1程度が好ましい。続いて、この反応溶液にペプチドを加えた後、pHを、酸、例えば0.1N塩酸等を用いて9.0程度に下げ、室温で一晩攪拌を行うと、活性化された水酸基とペプチド鎖のアミノ基との間に結合し、本発明による多糖誘導体を得ることができる。ここで、糖残基とペプチドの結合様式にはイソウレア型（式(III)において、Wが基NHとなる場合）、ウレタン型（式(III)において、Wが酸素原子である場合）、イミドカルボネート型（式(IV)の場合）が存在する。本発明においてはこれらの結合様式が単独で生じた場合あるいは複合して生じた場合、いずれの場合も包含される。また上記の反応の過程で、二糖単位の一部水酸基が活性化されることなく、不活性のカルバメートを生ずる場合（分子中の水酸基のいずれかが基-CO-NH<sub>2</sub>に置換された場合）もあるが、この反応はペプチド鎖の結合を生じさせないので、出来るだけ防止するのが好ましい。

【0052】加えるペプチドの量は、活性化された水酸基に対して過剰量用いることが好ましい。また、添加するプロムシアンの量を調整することによって、ペプチドの導入量を増減させることが可能となる。

【0053】以上のようにして得た本発明による多糖誘導体に医薬化合物を化学結合させることによって、本発明による多糖誘導体を薬物担体として用いることが可能となる。医薬化合物の導入は、ペプチド鎖のアミノ基もしくはカルボキシル基を、医薬化合物の官能基もしくは活性化された置換基と反応させることによって行なえる。好ましい具体例を示せば下記の通りである。

【0054】例えば、本発明による多糖誘導体のペプチド鎖に、Lys残基を含むペプチドを用いた場合、このLys残基のε-アミノ基にカルボキシル基を有する薬物をアミド結合で導入し、〔ヒアルロン酸-ペプチド-薬物〕複合体もしくは〔コンドロイチン-ペプチド-薬物〕複合体を得ることができる。この場合、上述のプロムシアン法によるペプチド導入反応時には、このε-アミノ基は適当な保護基で保護し、反応終了後に脱保護する必要がある。例えば、代表的なアミノ基の保護であるBoc基でε-アミノ基を保護したLys残基（N-ε-Boc-Lys）を含むペプチドを導入した〔ヒアルロン酸-保護ペプチド〕複合体を弱酸処理、例えば、0.5N塩酸中、室温で一晩処理することにより、遊離のアミノ基を持つ〔ヒアルロン酸-ペプチド〕複合体を得ることができる。次に、この複合体を、例えば、1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液に溶解後、カルボキシル基を有する薬物のN-ヒドロキシスルフィドエステル（活性エステル）を加えて反応させることにより、〔ヒアルロン酸-ペプチド-薬物〕複合体を得ることができる。ここで薬物として、例えばメソトレキサート（MTX）を選択すれば、〔ヒアルロン酸-ペプチド-MTX〕複合体が得

られる。また、これらの複合体のペプチド末端のカルボキシル基にアミノ基を有する薬物をアミド結合で結合させても、〔ヒアルロン酸-ペプチド-薬物〕複合体もしくは、〔コンドロイチン-ペプチド-薬物〕複合体を得ることができる。

## 【0055】

## 【実施例】

(実施例1) ヒト臍帯由来ヒアルロン酸 (SIGMA社、H-1876、2.05g) を、pH5.0に調整した0.1M酢酸緩衝液 (20ml) に溶解後、ウシ睾丸ヒアルロニダーゼ (10mg) を加え、37℃で2時間反応させた。反応液をエタノール (1L) 中に加えて、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して1.74gの低分子化ヒアルロン酸を得た。この物質を次のように精製した。この物質 (1.72g) を、pH8.0に調整した10mMリン酸緩衝液 (17.2ml) に溶かし、プロナーゼE (SIGMA社、3.4mg) を加えた後、40℃で20時間反応させ、ヒアルロン酸に結合している蛋白を消化した。反応液を50mlに濃縮し5.8gの塩化ナトリウムを加えた後、2Mの塩化ナトリウムを含むセチルビリジニウムクロライド (CPC) の10%水溶液 (15.3ml) を加え、さらにCPCの0.05%水溶液 (6.12ml) を加えた。この溶液をポアサイズ0.45μmのメンブランフィルター (日本ミリポア工業株式会社、HAWP膜) を用いて吸引ろ過し、得られたろ液 (810ml) に上述のCPCの0.05%水溶液3.24mlを加えた。析出した沈殿物を集め、10%のエタノールを含む2M塩化ナトリウム水溶液 (55ml) に溶解後、エタノール (240ml) を加えた。析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、精製された低分子化ヒアルロン酸0.96gを得た。この物質の分子量は、デキストラランを標準物質としてTSKgel G4000PWカラム (東ソー株式会社) を用いたゲルろ過法で、 $1 \times 10^5$  であった。

【0056】この物質 (80mg) を水 (6ml) に溶解し、プロムシアン (36mg) を加え、1N NaOHでpHを10.5～11.5に調整しながら、30分攪拌した。続いて、この反応液に、Lys残基のε-アミノ基をBoc基で保護したGly-Gly-Gly-Lys (Boc) (81mg) を水 (3ml) に溶かして加え、0.1N HClでpHを9.0に調整した後、室温で17時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (100mg) を加えた後、エタノール (40ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、80mgのヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys (Boc) 複合体を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/15と算出された。この物質 (80mg) を0.5N HCl (8ml) に溶解後、室温で18時間処理した。反応液を中和した後、エタノール (18ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、Lys残基のε-アミノ基

が脱保護されたヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys複合体 (70mg)を得た。45mgのメソトレキサート (MTX) をジメチルホルムアミド (1ml) に溶解後、N,N'-ジシクロヘキシリカルボジイミド (20.6mg) を加え、4℃で17時間反応させた。反応液にN-ヒドロキシスクシンイミド (11.5mg) とピリジン16μlを加え、室温で1.5時間反応させた。一方、上記ヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys複合体 (40mg) を、1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (4ml) に溶解後、上記反応液の0.5mlを加えて、室温で4時間反応させた。反応液にエタノール (18ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、40mgのヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターンをそれぞれ図1および図2に示す。本複合体のMTX含量は紫外部 (306nm) の吸光度分析によると6.4% (重量%) であった。

【0057】(実施例2) 実施例1で得られた低分子化ヒアルロン酸

(80mg) を水 (6ml) に溶解し、プロムシアン (41mg) を加え、1N NaOHでpHを10.5～11.5に調整しながら40分間攪拌した。続いて、この反応液に、Lys残基のε-アミノ基をBoc基で保護したGly-Phe-Gly-Lys (Boc) (104mg) を水 (3ml) に溶かして加え、0.1N HClでpHを9.0に調整した後、室温で18時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (100mg) を加えた後、エタノール (40ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、93mgのヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys (Boc) 複合体を得た。本複合体の置換度は吸光度法により、1/12と算出された。この複合体 (91mg) を実施例1と同様に酸処理して、86mgのヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys複合体を得た。この物質の紫外・可視部吸収スペクトルを図3に示す。本複合体 (30mg) を1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (3ml) に溶解後、実施例1の方法に準じて調製したMTXの活性エステル溶液0.5mlを加え、室温で3時間反応させた。反応液にエタノール (14ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、30mgのヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを図4に示す。本複合体のMTX含量は、紫外部 (308nm) の吸光度分析によると、1.2% (重量%) であった。

【0058】(実施例3) 実施例1で得た低分子化ヒアルロン酸 (80mg) を水 (6ml) に溶解後、プロムシアン (19mg) を加え、1N NaOHでpHを10.5～11.5に調整しながら、40分攪拌した。続いてこの反応液に、ε-アミノ基をBoc基で保護したNε-

Boc-Lys (9.8 mg) を水 (4 ml) に溶かして加え、0.1 N HCl で pH を 9.0 に調整した後、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (1.00 mg) を加えた後、エタノール (4.0 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、7.9 mg のヒアルロン酸-Lys (Boc) 複合体を得た。本複合体の置換度は NMR 法によって、1/1.9 と算出された。この複合体 (7.6 mg) を実施例 1 の方法と同様に酸処理して Boc 基を除去し、6.6 mg のヒアルロン酸-Lys 複合体を得た。本複合体 (3.0 mg) を 1% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (6 ml) に溶解後、実施例 1 の方法に準じて調製した MTX の活性エステル溶液 0.5 ml を加え、室温で 3 時間反応させた。反応液にエタノール (3.5 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、2.9 mg のヒアルロン酸-Lys-MTX 複合体を黄色粉末として得た。本複合体の MTX 含量は、紫外部 (306 nm) の吸光度分析から 8.3% (重量%) と決定された。

【0059】(実施例 4) 実施例 1 で得た低分子ヒアルロン酸 (8.0 mg) を水 (6 ml) に溶解後、プロムシアン (4.3 mg) を加え、1 N NaOH で pH を 10.5 ~ 11.5 に調整しながら、40 分攪拌した。続いてこの反応液に ε - アミノ基を Boc 基で保護した。Nε-Boc-Lys (9.9 mg) を水 (4 ml) に溶かして加え、0.1 N HCl で pH を 9.0 に調整した後、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (1.00 mg) を加えた後、エタノール (5.5 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、9.0 mg のヒアルロン酸-Lys (Boc) 複合体を得た。本複合体の置換度は NMR 法によって 1/6.6 と算出された。この複合体 (8.4 mg) を実施例 1 の方法と同様に酸処理して Boc 基を除去し、7.5 mg のヒアルロン酸-Lys 複合体を得た。本複合体 (3.0 mg) を 1% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (3 ml) に溶解後、実施例 1 の方法に準じて調製した MTX の活性エステル溶液 (0.5 ml) を加え、室温で 3 時間反応させた。反応液にエタノール (2.0 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、3.4 mg のヒアルロン酸-Lys-MTX 複合体を黄色粉末として得た。本複合体の MTX 含量は、紫外部 (306 nm) の吸光度分析により 18% (重量%) と決定された。

【0060】(実施例 5) コンドロイチン (生化学工業社、8.0 mg) を水 (6 ml) に溶解後、プロムシアン (4.0 mg) を加え、1 N NaOH で pH を 10.5 ~ 11.5 に調整しながら、30 分攪拌した。続いて、この反応液に ε - アミノ基を Boc 基で保護した。Nε-Boc-Lys (9.8 mg) を水 (6 ml) に溶かして加え、0.1 N HCl で pH を 9.0 に調整した後、室温で 1.6 時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (1.00 mg) を加えた後、エタノール (6.0 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、7.7 mg のコンドロイチン-Lys (Boc) 複合体を得た。本複合体の置換度は N

MR 法により、1/2.4 と算出された。この複合体 (7.7 mg) を実施例 1 の方法と同様に酸処理して Boc 基を除去し、5.7 mg のコンドロイチン-Lys 複合体を得た。本複合体 (3.1 mg) を 1% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (3 ml) に溶解後、実施例 1 の方法に準じて調製した MTX の活性エステル溶液 0.5 ml を加え、室温で 3 時間反応させた。反応液にエタノール (2.0 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、2.9 mg のコンドロイチン-Lys-MTX 複合体を黄色粉末として得た。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターンをそれぞれ図 5 および図 6 に示す。本複合体の MTX 含量は紫外部 (308 nm) の吸光度分析から、7.1% (重量%) と決定された。

【0061】(実施例 6) 実施例 1 に準じてヒト臍帯由来ヒアルロン酸 1.97 g にウシ睾丸ヒアルロニダーゼを作用させ、分子量が  $2 \times 10^5$  の低分子化ヒアルロン酸 (1.02 g) を得た。この物質 (6.0 mg) を水 (6 ml) に溶解後、プロムシアン (8.0 mg) を加え、1 N NaOH で pH を 10.5 ~ 11.5 に調整しながら、50 分攪拌した。続いてこの反応液に G1y-Phe-A1a (6.6 mg) を水 (3 ml) に溶かして加え、0.1 N HCl で pH を 9.0 に調整した後、室温で 2.0 時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (1.00 mg) を加えた後、エタノール (4.0 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して 8.1 mg のヒアルロン酸-G1y-Phe-A1a 複合体を得た。この物質の紫外・可視部吸収スペクトルを図 7 に示す。本複合体の置換度は、吸光度法により 1/4.2 と算出された。

【0062】(実施例 7) 実施例 6 で得た低分子ヒアルロン酸 (6.1 mg) を水 (6 ml) に溶解後、プロムシアン (9.0 mg) を加え、1 N NaOH で pH を 10.5 ~ 11.5 に調整しながら、50 分攪拌した。続いてこの反応液に G1y-Phe-Phe (8.3 mg) を水 (3 ml) に溶かして加え、0.1 N HCl で pH を 9.0 に調整した後、室温で 2.0 時間反応させた。反応液に酢酸ナトリウム (1.00 mg) を加えた後、エタノール (4.0 ml) を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、8.3 mg のヒアルロン酸-G1y-Phe-Phe 複合体を得た。本複合体の置換度は吸光度法より 1/4.4 と算出された。

【0063】(実施例 8) ヒト臍帯由来ヒアルロン酸 (SIGMA 社、H-1876、2.01 g) を、pH 5.0 に調製した 0.1 M 酢酸緩衝液 (2.01 ml) に溶解後、ウシ睾丸ヒアルロニダーゼ (1.0 mg) を加え、37°C で 1.5 時間反応させた。反応液をエタノール (8.00 ml) に加えて、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して 1.72 g の低分子粗精製ヒアルロン酸を得た。この物質 (8.65 mg) を実施例 1 に準じて精製し、6.82 mg の精製低分子化ヒアルロン酸を得た。この物質の分子量を実施例 1 に準じて測定すると、 $5 \times 10^5$  であった。

23

この低分子ヒアルロン酸（80mg）を水（6ml）に溶解した後、プロムシアン（36mg）を加え、1N NaOHでpHを10.5～11.5に調整しながら室温で35分攪拌した。この反応液にNε-Boc-Lys（98mg）を水4mlに溶かして加え、0.1N HClでpHを9.0に調整した後、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸ナトリウム（100mg）を加えた後、エタノール（37ml）を加えて析出した沈殿を集め、真空乾燥して、90mgのヒアルロン酸-Lys（Boc）複合体を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/5.6と算出された。この複合体（86mg）を0.5N HCl（8.6ml）に溶解して、室温で一晩攪拌した。反応液を中和した後、エタノール（40ml）を加え、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、Boc基の除去されたヒアルロン酸-Lys複合体（75mg）を得た。114mgのMTXをジメチルホルムアミド（2.5ml）に溶解した後、N,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド（51.5mg）を加え、4℃で一晩反応させた。反応液にN-ヒドロキシスクシンイミド（29mg）とビリジン40μlを加え、室温で4時間反応させた。一方、上記ヒアルロン酸-Lys複合体（51mg）を1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液（5ml）に溶解後、上記反応液の0.83mlを加えて、室温で3時間反応させた。反応液にエタノール（25ml）を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、56mgのヒアルロン酸-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部（306nm）の吸光度分析によると16%（重量%）であった。

【0064】（実施例9）Lys（Boc）の代わりにGly-Gly-Gly-Lys（Boc）（86mg）を用い、加えるプロムシアンの量を38mgとした以外は実施例8と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys（Boc）複合体（94mg）を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/11と算出された。この複合体（85mg）を実施例8に準じて酸処理することにより、脱保護されたヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys複合体（76mg）を得た。この複合体（51mg）に、MTXの活性エステルを実施例8と同様に作用させることにより、50mgのヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部（307nm）の吸光度分析によると8.9%（重量%）であった。

【0065】（実施例10）Lys（Boc）の代わりにGly-phe-Gly-Lys（Boc）（109mg）を用い、加えるプロムシアンの量を45mgとした以外は実施例8と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys（Boc）複合体（95mg）を得た。本複合体の置換度は吸光度法により、1/8.6と算出された。この複合体（91mg）を実施例8

10

20

30

40

24

に準じて酸処理することにより、脱保護されたヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys複合体（81mg）を得た。この複合体（50mg）に、MTXの活性エステルを実施例8と同様に作用させることにより、54mgのヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部（307nm）の吸光度分析によると17%（重量%）であった。

【0066】（実施例11）実施例8で得た粗精製のヒアルロン酸0.93gを、pH5.0に調製した0.1M酢酸緩衝液（93ml）に溶解した後、牛睾丸ヒアルロニダーゼ9.3mgを加え、37℃で6.5時間反応させた。反応液にエタノール（46.5ml）を加え、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して0.78gの低分子ヒアルロン酸を得た。このヒアルロン酸を実施例1に準じて精製し、274mgの精製低分子ヒアルロン酸を得た。この物質の分子量を実施例1に準じて測定すると、3×10<sup>4</sup>であった。この低分子ヒアルロン酸（80mg）を水（6ml）に溶解した後、プロムシアン（36mg）を加え、1N NaOHでpHを10.5～11.5に調整しながら室温で30分攪拌した。この反応液にLys（Boc）（99mg）を水3mlに溶かして加え、0.1N HClでpHを9.0に調整した後、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸ナトリウム（100mg）を加えた後、エタノール（50ml）を加え、析出した沈殿を集め、真空乾燥して、94mgのヒアルロン酸-Lys（Boc）複合体を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/7.6と算出された。この複合体（90mg）を0.5N HCl（9.0ml）に溶解して、室温で一晩攪拌した。反応液を中和した後、エタノール（70ml）を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、Boc基の除去されたヒアルロン酸-Lys複合体（81mg）を得た。この複合体（51mg）を1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液（5ml）に溶解後、実施例8に準じて調製したMTXの活性エステル溶液0.83mlを加えて、室温で3.5時間反応させた。反応液にエタノール（25ml）を加えて析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、52mgのヒアルロン酸-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部（307nm）の吸光度分析によると15%（重量%）であった。

【0067】（実施例12）Lys-（Boc）の代わりにGly-Gly-Gly-Lys（Boc）（87mg）を用い、加えるプロムシアンの量を34mgとした以外は実施例11と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys（Boc）複合体（94mg）を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/15と算出された。この複合体（91mg）を実施例11に準じて酸処理することにより、脱保護されたヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys（Boc）複合体（81mg）を得た。この複合体（51mg）に、MTX

の活性エステルを実施例11と同様に作用させることにより、4.8mgのヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると8.2%(重量%)であった。

【0068】(実施例13) Lys(Boc)の代わりにGly-Phe-Gly-Lys(Boc)(108mg)を用い、加えるプロムシアンの量を4.3mgとした以外は実施例11と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)複合体(11.4mg)を得た。本複合体の置換度は吸光度法により、1/8.1と算出された。この複合体(11.0mg)を実施例11に準じて酸処理することにより、脱保護されたヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys複合体(9.7mg)を得た。この複合体(5.1mg)に、MTXの活性エステルを実施例11と同様に作用させることにより、5.3mgのヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると19%(重量%)であった。

【0069】(実施例14) Ne-Boc-Lysの代わりにGly-Gly-Gly-Lys(Boc)(8.7mg)用い、加えるプロムシアンの量を4.1mgとした以外は実施例5と同様に反応を行ない、コンドロイチン-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)複合体(8.1mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/5.5と算出された。この複合体(7.8mg)を実施例5に準じて酸処理することにより、脱保護されたコンドロイチン-Gly-Gly-Gly-Lys複合体(7.1mg)を得た。この複合体(6.0mg)に、MTX(4.5mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、5.6mgのコンドロイチン-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(307nm)の吸光度分析によると3.1%(重量%)であった。

【0070】(実施例15) Ne-Boc-Lysの代わりにGly-Phe-Gly-Lys(Boc)(11.4mg)を用い、加えるプロムシアンの量を4.1mgとした以外は実施例5と同様に反応を行い、コンドロイチン-Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)複合体(8.2mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/2.6と算出された。この複合体(8.0mg)を実施例5に準じて酸処理することにより、脱保護されたコンドロイチン-Gly-Gly-Gly-Lys複合体(7.6mg)を得た。この複合体(6.0mg)に、MTX(4.5mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、5.5mgのコンドロイチン-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると6.5%(重量%)であった。

【0071】(実施例16) Ne-Boc-Lysの代わりにBoc-Glu(Lys)(7.5mg)を用い、加えるプロムシアンの量を3.7mgとした以外は実施例5と同様に反応を行い、Boc-Glu(Lys-コンドロイチン)複合体(8.6mg)を得た。この複合体(8.4mg)を実施例5に準じて酸処理することにより、脱保護されたGlu(Lys-コンドロイチン)複合体(7.8mg)を得た。この複合体(6.0mg)に、MTX(4.5mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、5.6mgのMTX-Glu(Lys-コンドロイチン)複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると5.7%(重量%)であった。

【0072】(実施例17) Ne-Boc-Lysの代わりにLeu-Ala-Leu-Lys(Boc)(11.7mg)を用い、加えるプロムシアンの量を3.5mgとした以外は実施例5と同様に反応を行い、コンドロイチン-Leu-Ala-Leu-Lys(Boc)複合体(6.5mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/5.0と算出された。この複合体(6.3mg)を実施例5に準じて酸処理することにより、脱保護されたコンドロイチン-Leu-Ala-Leu-Leu-Lys複合体(5.4mg)を得た。この複合体(5.0mg)に、MTX(4.5mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、4.5mgのコンドロイチン-Leu-Ala-Leu-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(307nm)の吸光度分析によると6.0%(重量%)であった。

【0073】(実施例18) Ne-Boc-Lysの代わりにPhe-Phe-Lys(Boc)(9.8mg)を用い、加えるプロムシアンの量を3.7mgとした以外は実施例5と同様に反応を行い、コンドロイチン-Phe-Phe-Lys(Boc)複合体(8.1mg)を得た。この複合体(7.8mg)を実施例5に準じて酸処理することにより、脱保護されたコンドロイチン-Phe-Phe-Lys複合体(7.2mg)を得た。この複合体(6.0mg)に、MTX(4.5mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、5.6mgのコンドロイチン-Phe-Phe-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(307nm)の吸光度分析から4.7%(重量%)であった。

【0074】(実施例19)実施例1に準じて調製した分子量 $1 \times 10^6$ の低分子ヒアルロン酸(8.0mg)を水(6ml)に溶解した後、プロムシアン(3.2mg)を加え、1N NaOHでpHを10.5~11.5に調整しながら室温で30分攪拌した。この反応液にBoc-Glu(Lys)(7.5mg)を水2mlに溶かして加え、0.1N HClでpHを9.0に調整した後、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸ナトリウム(10.0mg)を加えた後、エタノール(40ml)を加えて析出した沈

27

濁を集め、真空乾燥して、9.2 mgのBoc-Glu(Lys-ヒアルロン酸)複合体を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/8.0と算出された。この複合体(9.0 mg)を0.5 N HC1(9.0 ml)に溶解して、室温で一晩攪拌した。反応液を中和した後、エタノール4.2 mlを加え、析出した沈澱物を集め、真空乾燥して、Boc基の除去されたGlu(Lys-ヒアルロン酸)複合体(8.6 mg)を得た。この複合体(6.0 mg)を1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液(5 ml)に溶解した後、実施例8に準じて調製したMTX(4.5 mg)の活性エステルを加えて、室温で3時間反応させた。反応液にエタノール(3.5 ml)を加え、析出した沈澱物を集め、真空乾燥して、6.2 mgのMTX-Glu(Lys-ヒアルロン酸)複合体を黄色粉末として得た。本複合体MTX含量は、紫外部(306 nm)の吸光度分析から13%(重量%)と算出された。

【0075】(実施例20) Boc-Glu(Lys)の代わりにLeu-Ala-Leu-Lys(Boc)(1.17 mg)を用い、加えるプロムシアンの量を4.2 mgとした以外は実施例19と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Leu-Ala-Leu-Lys(Boc)複合体(8.9 mg)を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/6.8と算出された。この複合体(8.6 mg)を実施例19に準じて酸処理することにより、脱保護されたヒアルロン酸-Leu-Ala-Leu-Lys(Boc)複合体(7.5 mg)を得た。この複合体(6.0 mg)に、MTX(4.5 mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、6.4 mgのヒアルロン酸-Leu-Ala-Leu-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306 nm)の吸光度分析によると14%(重量%)であった。

【0076】(実施例21) Boc-Glu(Lys)の代わりにPhe-Phe-Lys(Boc)(9.8 mg)を用い、加えるプロムシアンの量を3.7 mgとした以外は実施例19と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Phe-Phe-Lys(Boc)複合体(9.6 mg)を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/6.6と算出された。この複合体(9.3 mg)を実施例19に準じて酸処理することにより、脱保護されたヒアルロン酸-Phe-Phe-Lys複合体(8.2 mg)を得た。この複合体(6.0 mg)に、MTX(4.5 mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、6.2 mgのヒアルロン酸-Phe-Phe-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306 nm)の吸光度分析によると17%(重量%)であった。

【0077】(実施例22)

(1) 実施例1に準じて調製した分子量 $1 \times 10^5$ の低分子化ヒアルロン酸(200 mg)に、過ヨウ素酸ナトリ

10

20

30

40

28

ウム(3.6 mg)を1.0 mlの水に溶かして加え、4°Cで7日間反応させた。この反応液を水に対して透析した後、酢酸ナトリウム(3.70 mg)を加えた。この液をエタノール(1.50 ml)中に加え、析出した沈澱を集め、真空乾燥して、ヒアルロン酸の開環アルデヒド体(1.66 mg)を得た

(2) このヒアルロン酸の開環アルデヒド体(1.66 mg)に、水素化ホウ素ナトリウム(1.66 mg)を0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液(1.66 ml)に溶かして加え、室温で一晩攪拌した。この反応液を酢酸でpH 5.0に調整した後に、エタノール(8.0 ml)を加え、析出した沈澱を集め、真空乾燥して、ヒアルロン酸の開環ポリアルコール体(1.50 mg)を得た。この物質のゲルろ過溶出パターン(検出: 示差屈折率)を図11として示す。

(3) この開環ポリアルコール体(7.0 mg)を水(6 ml)に溶解した後、プロムシアン(3.3 mg)を加え、1 N NaOHでpHを10.5~11.5に調整しながら室温で30分攪拌した。この反応液にNe-Boc-Lys(8.6 mg)を水3 mlに溶かして加え、0.1 N HC1でpHを9.0に調整した後、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸ナトリウム(1.00 mg)を加えた後、エタノール(4.5 ml)を加え、析出した沈澱を集め、真空乾燥して、6.9 mgの開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys(Boc)複合体を得た。本複合体の置換度はNMR法により、1/13と算出された。この複合体(6.7 mg)を0.5 N HC1(6.7 ml)に溶解して、室温で一晩攪拌した。反応液を中和した後、エタノール4.0 mlを加え、析出した沈澱物を集め、真空乾燥して、Boc基の除去された、開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys複合体(5.7 mg)を得た。この複合体(4.5 mg)を1%NaHCO<sub>3</sub>水溶液(4.5 ml)に溶解した後、実施例8に準じて調製したMTX(3.5 mg)の活性エステルを加えて、室温で3時間反応させた。反応液にエタノール(4.0 ml)を加え、析出した沈澱物を集め、真空乾燥して、4.7 mgの開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は、紫外部(306 nm)の吸光度分析によると12%(重量%)と算出された。

【0078】(実施例23) Ne-Boc-Lysの代わりにGly-Phe-Gly-Lys(Boc)(9.5 mg)を用い、加えるプロムシアンの量を3.7 mgとした以外は実施例22と同様に反応を行い、開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)複合体(7.9 mg)を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/11と算出された。この複合体(7.7 mg)を実施例22に準じて酸処理することにより、Boc基の除去された開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys複合体(6.0

mg)を得た。この複合体(50mg)に、MTX(38mg)の活性エステルを実施例8と同様に反応させることにより、54mgの開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると14%(重量%)であった。

【0079】(実施例24)低分子化ヒアルロン酸の代わりにコンドロイチン(生化学工業社、200mg)を用いた以外は実施例22と同様に反応を行い、コンドロイチンの開環ポリアルコール体(134mg)を得た。実施例22に準じて、この物質(70mg)にプロムシアン(33mg)を作用させた後、N $\epsilon$ -Boc-Lys(86mg)を反応させて、開環ポリアルコール化コンドロイチン-Lys(Boc)複合体(64mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により1/30と算出された。この複合体(62mg)を、実施例22に準じて酸処理することにより、Boc基の除去された開環ポリアルコール化コンドロイチン-Lys複合体(56mg)を得た。この複合体(45mg)に、MTX(35mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、43mgの開環ポリアルコール化コンドロイチン-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると6.4%(重量%)であった。

【0080】(実施例25)実施例24において得られたコンドロイチンの開環ポリアルコール体(65mg)に、実施例22に準じてプロムシアン(39mg)を作用させた後、Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)(87mg)を反応させることによって、開環ポリアルコール化コンドロイチン-Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)複合体(62mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により1/37と算出された。この複合体(60mg)を実施例22と同様に酸処理することによって、Boc基の除去された開環ポリアルコール化コンドロイチン-Gly-Phe-Gly-Lys複合体(51mg)を得た。この複合体(40mg)に、MTX(31mg)の活性エステルを実施例8と同様に反応させることにより、37mgの開環ポリアルコール化コンドロイチン-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると5.8%(重量%)であった。

【0081】(実施例26)低分子化ヒアルロン酸(200mg)に対して反応させる過ヨウ素酸ナトリウムの量を1/2に減じて18mgとした以外は実施例22と同様にして、開環の割合の低いヒアルロン酸開環ポリアルコール体(153mg)を得た。実施例22に準じて、この物質(65mg)にプロムシアン(36mg)を作用させた後、N $\epsilon$ -Boc-Lys(80mg)を反応させること

により、開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys(Boc)複合体(73mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により1/9.0と算出された。この複合体(71mg)を、実施例22に準じて酸処理することによって、Boc基の除去された開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys複合体(65mg)を得た。この複合体(50mg)に、MTX(38mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、53mgの開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると16%(重量%)であった。

【0082】(実施例27)実施例26において得られたヒアルロン酸の開環ポリアルコール体(65mg)に、実施例22に準じてプロムシアン(27mg)を作用させた後、Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)(85mg)を反応させることにより、開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)複合体(76mg)を得た。本複合体の置換度はNMR法により1/14と算出された。この複合体(74mg)を実施例22と同様に酸処理することによって、Boc基の除去された開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys複合体(70mg)を得た。この複合体(50mg)に、MTX(38mg)の活性エステルを実施例8と同様に反応させることにより、49mgの開環ポリアルコール化コンドロイチン-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(306nm)の吸光度分析によると13%(重量%)であった。

【0083】(実施例28)Boc-Glu(Lys)の代わりにGly-Phe-Gly- $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -Lys(102mg)を用い、加えるプロムシアンの量を41mgとした以外は実施例19と同様に反応を行い、ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly- $\alpha$ -Boc- $\epsilon$ -Lys複合体(100mg)を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/7.1と算出された。この複合体(97mg)を実施例19に準じて酸処理することによって、脱保護されたヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly- $\epsilon$ -Lys複合体(91mg)を得た。この複合体(60mg)に、MTX(45mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、63mgのヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly- $\epsilon$ -Lys- $\alpha$ -MTX複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(309nm)の吸光度分析によると14%(重量%)であった。

【0084】(実施例29)Boc-Glu(Lys)の代わりにBoc-Gly-Phe-Gly-Lys(102mg)を用い、加えるプロムシアンの量を41mgとした以外は実施例19と同様に反応を行い、Boc-Gly-Phe-Gly-Lys-ヒアルロン酸複合体

31

(9.8 mg)を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/10と算出された。この複合体(9.6 mg)を実施例19に準じて酸処理することによって、脱保護されたGly-Phe-Gly-Lys-ヒアルロン酸複合体(9.1 mg)を得た。この複合体(7.0 mg)に、MTX(5.4 mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、7.1 mgのMTX-Gly-Phe-Gly-Lys-ヒアルロン酸複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(308 nm)の吸光度分析によると16%（重量%）であった。

**【0085】**（実施例30）Boc-Glu(Lys)の代わりにBoc-Gly-Gly-Gly-Lys(8.4 mg)を用い、加えるプロムシアンの量を4.1 mgとした以外は実施例19と同様に反応を行い、Boc-Gly-Gly-Gly-Lys-ヒアルロン酸複合体(9.9 mg)を得た。本複合体の置換度は、NMR法により1/6.6と算出された。この複合体(9.7 mg)を実施例19に準じて酸処理することによって、脱保護されたGly-Gly-Gly-Lys-ヒアルロン酸複合体(8.9 mg)を得た。この複合体(7.0 mg)に、MTX(5.4 mg)の活性エステルを実施例8と同様にして反応させることにより、7.6 mgのMTX-Gly-Gly-Gly-Lys-ヒアルロン酸複合体を黄色粉末として得た。本複合体のMTX含量は紫外部(308 nm)の吸光度分析によると16%（重量%）であった。

**【0086】**（実施例31）実施例1に準じて調整した分子量 $1 \times 10^5$ の低分子化ヒアルロン酸(1.61 mg)に、過ヨウ素酸ナトリウム(2.9 mg)を1.0 mlの水に溶かして加え、4°Cで10日間反応させた。この反応液を水に対して透析した後、酢酸ナトリウム(2.68 mg)を加えた。この液をエタノール(1.34 ml)中に加え、析出した沈澱を集め、真空乾燥して、ヒアルロン酸の開環アルデヒド体(1.38 mg)を得た。この物質のゲルろ過溶出パターン（検出：示差屈折率）を図12として示す。

#### 【0087】（実施例1）試料と方法

実施例3（ヒアルロン酸-Lys-MTX）の複合体(1 mg)を、ウシ睾丸ヒアルロニダーゼ(1.00 μg)の存在下および非存在下0.1 M酢酸緩衝液(pH 5.0, 200 μl)中37°Cで反応させ、0, 1, 4および24時間の反応液を実施例1記載と同じゲルろ過法により分析した。

#### 結果

10

32

結果を図8に示す。図8は反応時間とその反応時間での反応液においてピークの溶出が現われる溶出時間との関係を示すグラフである。図中○印線および●印線は、ヒアルロン酸-Lys-MTXについてヒアルロニダーゼが存在しない場合およびヒアルロニダーゼが存在する場合におけるそれぞれの結果を示す。図8より、この複合体にはヒアルロニダーゼの作用による低分子化が認められ、従って生体内において徐々に分解を受け、長時間の体内残留は起こらないことが期待される。

20

**【0088】**（実験例2）実施例1に示した複合体（ヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX）を生理食塩水に溶かし、4.0 mg/mlのものを準備した。別に担癌ラット数匹より血液を採取し、遠心分離によりプラズマを得た。直ちにプラズマ1.90 μlに上記の水溶液1.0 μlを加え、37°Cにて一定時間インキュベートした。各時間のサンプルについてメタノール、クロロホルムによる除蛋白処理を行った後に、HPLC(GPC, カラム：TSK-gel G4000P WXL, カラム温度：40°C, 溶出液：0.1M-NaCl水溶液, 検出：307 nmにおける紫外部吸収)にて分析した。0時間を100%とした時の各時間後の複合体の量の変化を図9に示す。図9より本発明物質が薬物送達に必要な時間内において十分な血中安定性を示すことがわかる。

30

#### 【0089】（実験例3）試料と方法

実施例4および実施例5に準じて調製したヒアルロン酸-Lys-<sup>3</sup>H-MTXおよびコンドロイチン-Lys-<sup>3</sup>H-MTXをそれぞれ試料Aおよび試料Bとした。ICR系の雄性マウスを用いて、Sarcoma 180を鼠頸部皮下に移植し、10日後のマウスを実験に供した。試料を生理食塩水に溶解し、1群3匹のマウスを用い、尾静脈より試料AおよびBを2.0 mg/kgを投与した。投与後6時間に大腿動脈および静脈を切断し、血液を採取後、癌組織を摘出した。血液を遠心分離して得られた血清と癌組織を燃焼装置を用いて燃焼し、放射活性を液体シンチレーション法にて測定し、濃度を求めた。

#### 結果

結果を表1に示す。表1より、試料の癌組織中濃度は血清中濃度に比べて高く、特に試料Aについて顕著であった。

#### 【0090】

#### 【表1】

試 料	血 清 中 濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{ml} \pm \text{S.E.}$ )	癌 組 織 中 濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{g} \pm \text{S.E.}$ )
A	0. 646 ± 0. 068	7. 182 ± 0. 799
B	0. 578 ± 0. 053	1. 397 ± 0. 141

【0091】(実験例4) 実施例22で得た複合体(開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys-MTX)のラットプラズマ中における安定性を実施例2に準じて評価した。複合体の残存率の経時変化は図10に示される通りである。図10により本発明による物質が薬物送達に必要な時間内において十分な血中安定性を示すことがわかる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒: 0.2% NaHCO<sub>3</sub>)を表わす。

【図2】ヒアルロン酸-Gly-Gly-Gly-Lys-MTX複合体のゲルろ過溶出パターン(検出: 303 nmにおける紫外外部吸収)を表わす。

【図3】ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 5 mg/ml、溶媒: 水)を表わす。

【図4】ヒアルロン酸-Gly-Phe-Gly-Lys-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 1.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒: 0.2% NaHCO<sub>3</sub>)を表わす。

【図5】コンドロイチン-Lys-MTX複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒: 0.2% NaHCO<sub>3</sub>)を表わす。

【図6】コンドロイチン-Lys-MTX複合体のゲルろ過溶出パターン(検出: 303 nmにおける紫外外部吸収)を表わす。

【図7】ヒアルロン酸-Gly-Phe-Ala複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 2.5 mg/ml、溶媒: 水)を表わす。

【図8】反応時間とその反応時間での反応液においてピークの溶出が現われる溶出時間との関係を示すグラフを表わす。

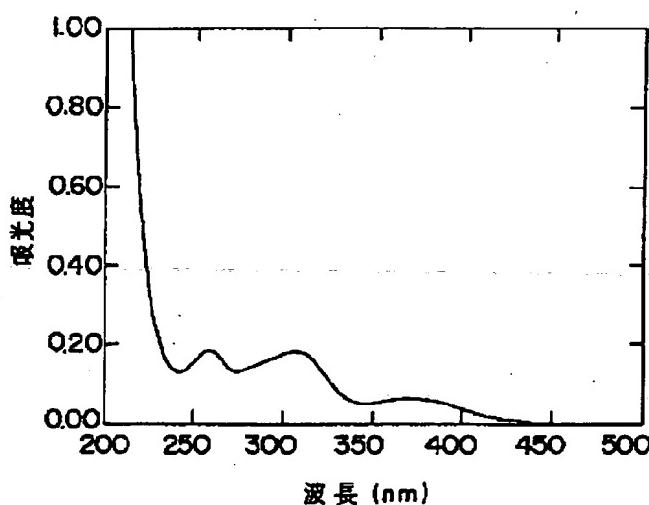
【図9】複合体として存在しているMTXの血漿中濃度の経時変化(in vitro)を示すグラフを表わす。

【図10】開環ポリアルコール化ヒアルロン酸-Lys-MTXの血漿中濃度の経時変化(in vitro)を示すグラフを表わす。

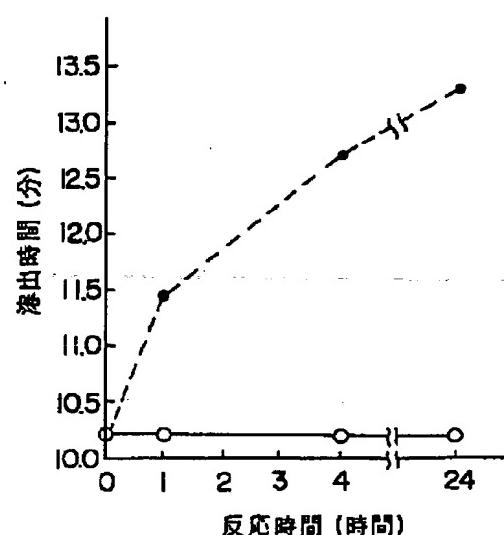
【図11】開環ポリアルコール化ヒアルロン酸のゲルろ過溶出パターン(検出: 示差屈折率)を表す。

【図12】開環アルデヒド化ヒアルロン酸のゲルろ過溶出パターン(検出: 示差屈折率)を表す。

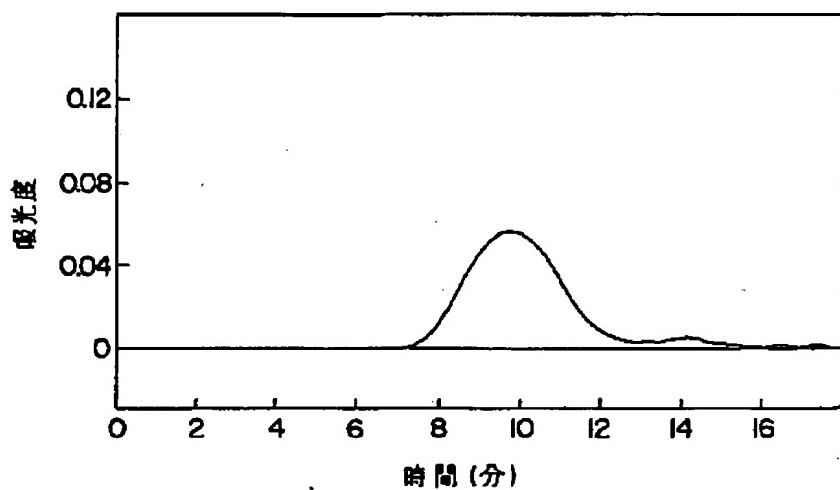
【図1】



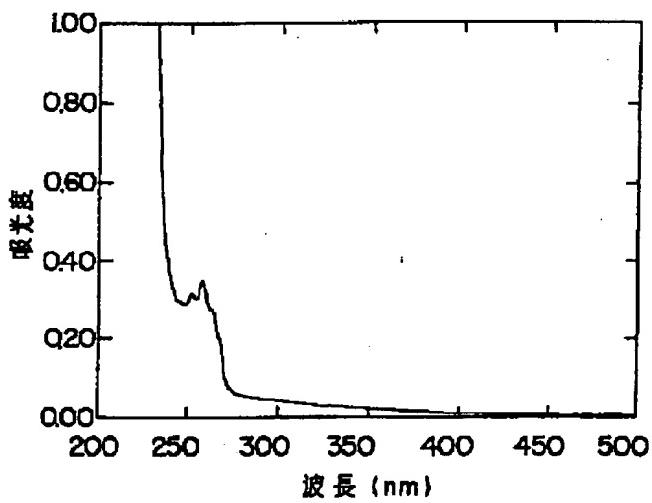
【図8】



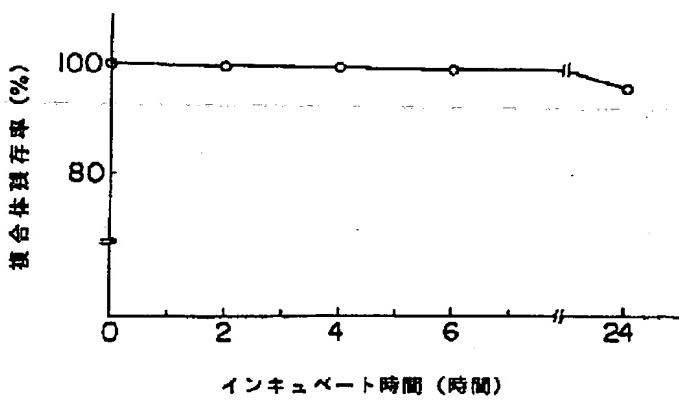
【図2】



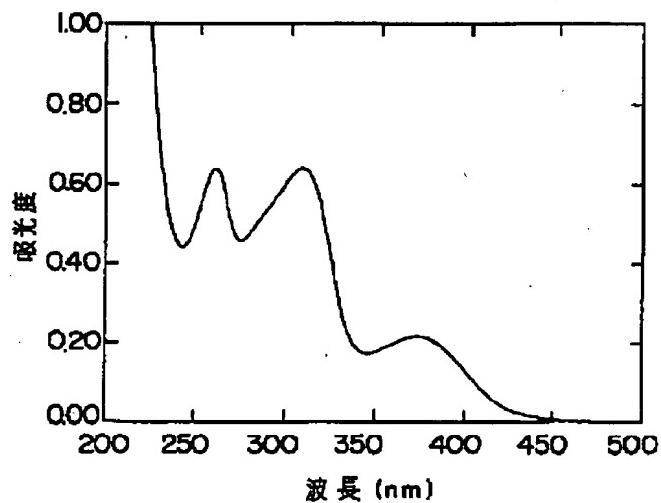
【図3】



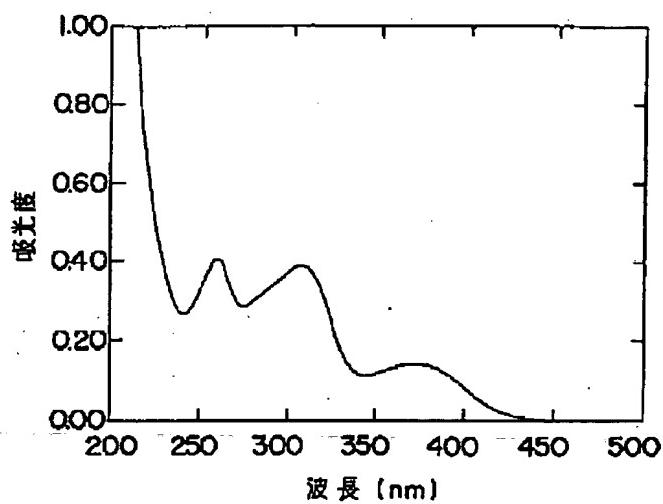
【図10】



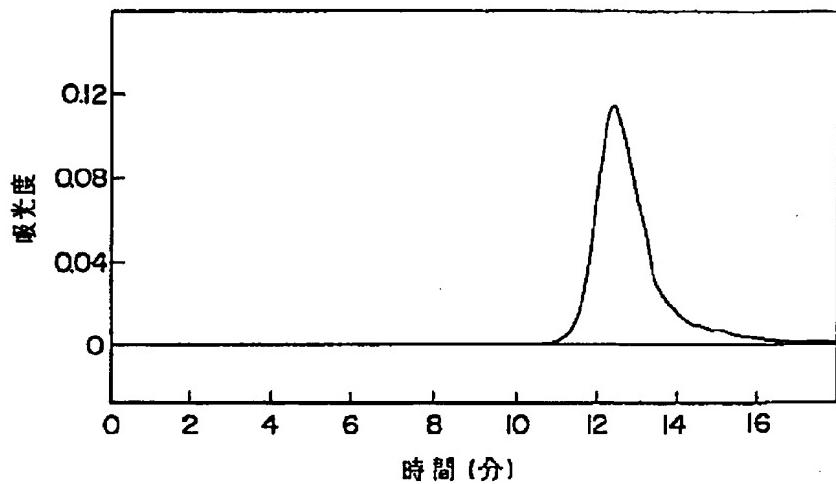
【図4】



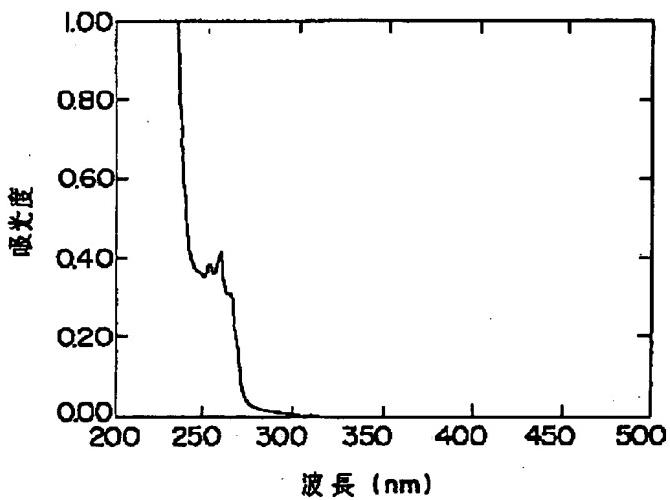
【図5】



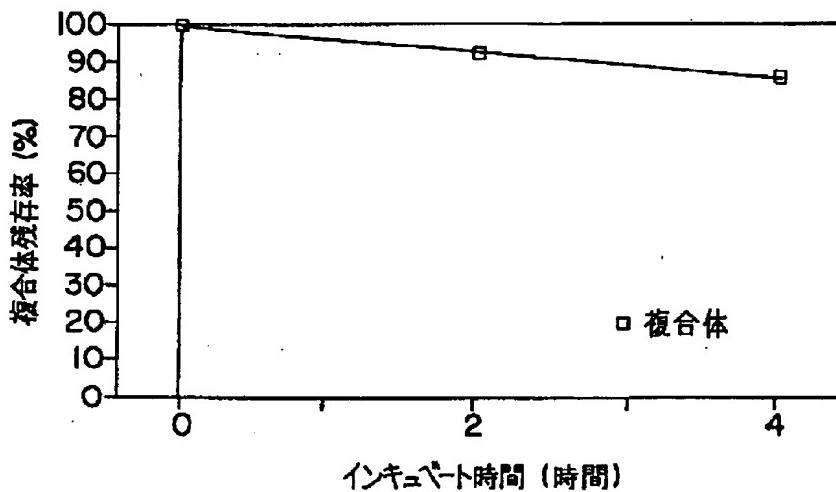
【図6】



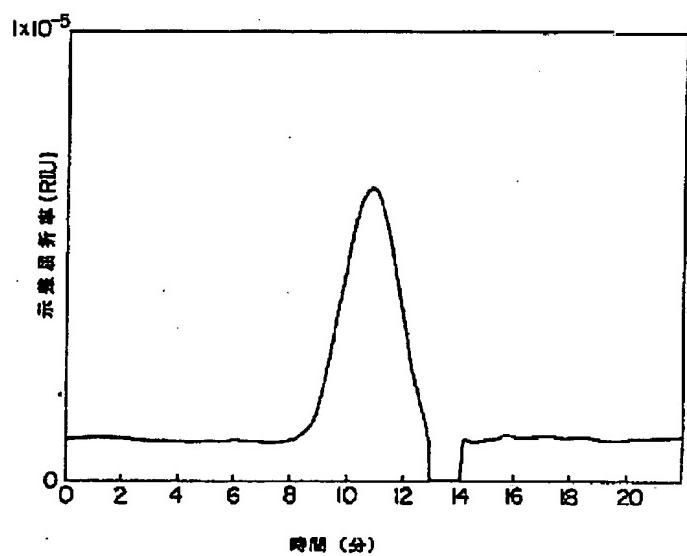
【図7】



【図9】



【図11】



【図12】

